

## Synthèse en Français

---

# Différenciation des bactéroïdes chez les *Aeschynomene*

---

**Thèse dirigée par :** Dr. Peter Mergaert & Pr. Mohamed Mars  
Co-dirigée par : Dr. Benoit Alunni

**Laboratoire :**  
*Différenciation Cellulaire lors de la Symbiose Rhizobium-Légumineuse*

# Résumé

Ce travail de thèse porte sur la thématique des interactions symbiotiques entre les plantes Légumineuses et les bactéries telluriques fixatrices d'azotes appelées rhizobia. Plus particulièrement, je me suis intéressée aux mécanismes qui président la différenciation cellulaire des bactéries au sein des organes symbiotiques formés par la plante.

## Contexte général de l'étude

L'azote est un élément fondamental dans la composition de la matière vivante. L'atmosphère est la principale réserve naturelle d'azote (80%) (Foth, 1990). Mais, malgré son abondance, c'est un facteur limitant dans le sol. Cette carence est responsable de la limitation de la productivité végétale dans beaucoup de sols et en particulier dans les sols cultivés. Pour que l'azote atmosphérique puisse être introduit dans le cycle de la matière vivante il faut qu'il soit préalablement fixé. Ainsi, seuls certains procaryotes appelés diazotrophes sont capables de réduire le diazote atmosphérique sous une forme combinée assimilable par les végétaux (Dommergues *et al.*, 1999) grâce à l'utilisation d'une métalloenzyme : la nitrogénase. Parmi ces organismes diazotrophes, certaines bactéries Gram négatives collectivement appelées rhizobium, ou des bactéries filamenteuses Gram positives du genre *Frankia* forment des endosymbioses avec respectivement des Légumineuses ou des non Légumineuses du genre *Parasponia* et des plantes actinorhiziennes (Franche *et al.*, 2008). Cette symbiose aboutit, dans tous ces cas, à la formation d'un organe spécialisé, la nodosité, qui se forme sur les racines de la plante hôte (dans certains cas aussi sur la tige). Cet organe est le siège d'une fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries au bénéfice de la plante. Au cours du développement de la nodosité, les bactéries pénètrent un poil absorbant et sont acheminées *via* un cordon d'infection vers les cellules symbiotiques, où elles sont relarguées par un processus d'endocytose. Les bactéries se retrouvent entourées d'une membrane dérivée de la membrane plasmique végétale et forment des symbiosomes, où elles se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote (Oldroyd et Downie, 2008 ; Desbrosse et Stougaard, 2011). Ces bactéries différenciées ont une physiologie qui est radicalement différente de celle des rhizobia vivant dans la rhizosphère et qui est adaptée au mode de vie symbiotique et à la fixation de l'azote.

La plupart des équipes de recherches travaillant sur la symbiose rhizobium-Légumineuse s'intéressent aux étapes précoces de l'interaction. Ainsi au cours des dernières

décennies, les bases moléculaires de la reconnaissance mutuelle entre les partenaires symbiotiques ont été élucidées (Stacey *et al.*, 2006). En conditions de carence azotée, les plantes produisent dans leurs exsudats racinaires des flavonoïdes qui sont reconnus par la bactérie et induisent la production et la sécrétion de lipochitooligosaccharides, les facteurs Nod, qui sont à leur tour reconnus par la plante. La perception des facteurs Nod initie à la fois l'organogenèse de la nodosité et l'infection bactérienne des tissus végétaux (Oldroyd *et al.*, 2011).

*A contrario*, notre équipe a concentré ses efforts de recherche depuis une quinzaine d'années sur des étapes tardives de l'interaction symbiotique et plus particulièrement sur la différenciation des cellules végétales et bactériennes permettant la mise en place du processus de fixation d'azote. Ainsi les cellules végétales qui sont infectées par les rhizobia (plusieurs milliers de bactéries par cellule), appelées cellules symbiotiques, subissent de profondes modifications pour permettre la présence de nombreux symbiosomes fixateurs d'azote dans leur cytoplasme. Durant leur différenciation, ces cellules sortent du cycle cellulaire classique (G1–S–G2–M) pour le convertir en un cycle d'endoréplication (ou endocycle), c'est-à-dire un cycle cellulaire simplifié ne comprenant que deux phases, une interphase G et une phase S (pour Synthèse d'ADN); les phases G2 et M (pour Mitose) ont disparu. La cellule ne se divise pas par la suite en deux cellules filles, ce qui provoque la polyploïdisation de la cellule. Ces endoréplifications successives conduisent à augmenter la ploïdie de 2C (cellule diploïde de méristème) à 64C (cellules symbiotiques matures polyploïdes; C étant le contenu en génome haploïde). La polyploïdisation permet d'accroître le volume cellulaire ainsi que l'activité métabolique des cellules hôtes. Un des acteurs clefs de ces endoréplifications successives est la protéine CCS52A dont l'action est la dégradation des cyclines mitotiques avant qu'elles ne puissent provoquer l'entrée en phase M du cycle cellulaire. Cela provoque l'arrêt de la division cellulaire mais n'affecte en rien la réplication de l'ADN, il en résulte des cellules endorépliquées, polyploïdes (Cebolla *et al.*, 1999; Vinardell *et al.*, 2003 ; Tarayre *et al.*, 2004; Fülöp *et al.*, 2005).

De façon similaire, les bactéries qui sont internalisées dans les cellules végétales se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote. L'équipe a montré que les bactéries pouvaient prendre plusieurs morphotypes différents (U, pour « *unmodified* » et E pour « *elongated* ») en fonction de l'hôte végétal considéré, indiquant que la plante gouverne la différenciation bactérienne (Mergaert *et al.*, 2006). Les bactéroïdes de morphotype E (par exemple chez *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*) subissent plusieurs modifications cellulaires et morphologiques

comme un allongement cellulaire couplé à une forte endoréplication du génome (les bactéroïdes deviennent polyploïdes) contribuant ainsi à une augmentation importante de la taille des cellules, ainsi qu'une perméabilité membranaire accrue rendant les bactéroïdes incapables de reprendre un cycle de division normal lorsque l'on remet ces bactéroïdes en culture. Les bactéroïdes de morphotype E subissent donc une différenciation terminale ou irréversible, c'est-à-dire qu'ils perdent toute capacité reproductrice (Mergaert *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2010).

Cette différenciation terminale des bactéroïdes est typiquement mise en place par toutes les Légumineuses du clade IRLC (pour *Inverted Repeat-Lacking Clade*) mais n'est pas conservée dans d'autres clades de Légumineuses. Dans ce second cas (par exemple chez *Phaseolus*, *Vigna*, *Lotus*, *Glycine*), les bactéries conservent comme dans l'état libre leur morphologie (morphotype U), leur capacité de division dans les symbiosomes et une viabilité importante. Les bactéroïdes de morphotype U subissent donc une différenciation réversible, sans altération du cycle cellulaire ni de perméabilisation de la membrane.

Le processus de différenciation cellulaire et morphologique des bactéroïdes en morphotype E chez *M. truncatula* est contrôlé en partie par une large famille de peptides antimicrobiens (environ 600 gènes chez *M. truncatula*) produits par la plante et spécifiquement exprimée dans les nodosités, appelée NCR (pour *Nodule-specific Cysteine Rich*) (Van de Velde *et al.*, 2010). Ces peptides NCR possèdent un peptide signal et des motifs conservés en cystéine. Ils sont adressés aux bactéroïdes et leur adressage est en partie contrôlé par une « signal peptidase complexe », spécifique des nodosités dont DNF1 est une sous unité (*dnf1* pour defective in nitrogen fixation 1 est un mutant de *Medicago truncatula* qui forme des nodosités non fonctionnels) (Wang *et al.*, 2010). L'inactivation de *dnf1* bloque l'adressage aux symbiosomes des peptides NCR qui restent bloqués dans le réticulum endoplasmique et les bactéroïdes restent indifférenciés (Van de Velde *et al.*, 2010). Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, cette « signal peptidase complexe » assurerait le clivage du peptide signal des NCR permettant ensuite leur transport via trafic vésiculaire à la membrane pér bactéroïdienne et donc aux symbiosomes (Van de Velde *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010).

Les peptides NCRs ressemblent à des défensines, des peptides antimicrobiens concourant à l'immunité innée, système immunitaire présent chez tous les Eucaryotes. Ainsi, les peptides NCRs, tout comme les défensines, perméabilisent les membranes bactériennes et présentent une activité antimicrobienne *in vitro*, tuant des bactéries et ayant un spectre d'activité large (Mergaert *et al.*, 2003 ; Van de Velde *et al.*, 2010).

Ainsi, un élément clef dans la différenciation des bactéroïdes est la protéine bactérienne BacA, un transporteur membranaire initialement découvert chez *S. meliloti* comme requis pour la différenciation des bactéries en bactéroïdes suite à leur relargage intracellulaire (Glazebrook *et al.*, 1993). BacA confère une résistance contre l'activité antimicrobienne des peptides NCRs (Haag *et al.*, 2011). Un mutant du gène *bacA* chez *S. meliloti* induit la formation de nodosités non-fonctionnelles chez *Medicago*, dans lesquelles les bactéries ne se différencient pas en bactéroïdes et meurent instantanément après avoir été confrontées aux peptides NCRs produits par les cellules hôtes (Haag *et al.*, 2011).

Le gène *bacA* de *S. meliloti* 1021 code une protéine de 381 acides aminés. Selon les prédictions bioinformatiques, cette protéine qui possède 8 domaines transmembranaires, serait semblable à des transporteurs membranaires de type ABC (Glazebrook, *et al.*, 1993). Les transporteurs ABC permettent soit l'import ou l'export d'une grande variété de substrats à travers les membranes biologiques. La structure canonique d'un transporteur ABC est composée de quatre domaines : deux domaines hydrophobes transmembranaires et deux domaines liant et hydrolysant l'ATP. La protéine BacA ne possède cependant pas la cassette ATPase.

En culture, la mutation *bacA* augmente la résistance de *S. meliloti* aux peptides antimicrobiens ayant une cible intracellulaire, tels que la bléomycine, la microcine B17, et Bac7, un peptide eucaryote riche en proline (Ichige, *et al.*, 1997 ; Marlow, *et al.*, 2009). Ce phénotype suggère que l'un des rôles de BacA serait d'internaliser les peptides antimicrobiens. L'étude du mutant *bacA* de *S. meliloti* révèle aussi une forte sensibilité aux agents inducteurs de stress membranaire tels que le SDS, l'éthanol et le déoxycholate (Ferguson, *et al.*, 2002). Chez *S. meliloti*, BacA est également impliquée dans la synthèse de lipide A, un composant essentiel des lipopolysaccharides qui constituent la membrane externe des bactéries à gram négatif (Ferguson *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2004). Des analyses en similarité de séquences ont suggéré que BacA serait un transporteur d'acides gras à longue chaîne qui une fois dans le périplasme assurerait la maturation des lipides A. Cette maturation permettrait de masquer les LPS pour la cellule hôte. En effet, le lipide A est un puissant antigène chez les Mammifères, ce qui faciliterait la persistance de la bactérie prolongeant ainsi l'infection (Ferguson *et al.*, 2004). La perte de BacA s'accompagne d'une baisse des contenus en VLCFA (*very-long-chain fatty acids*) des lipides A, expliquant la défection dans l'intégrité membranaire (Ferguson, *et al.*, 2004). Cependant, ces modifications des lipides A ne sont pas indispensables à la réalisation d'une infection chronique (Ferguson, *et al.*, 2005) indiquant qu'il s'agit probablement de la perte de la fonction de transport de peptides qui est

la cause de l'incapacité à se maintenir dans les nodosités.

Dans les nodosités, la protéine BacA de *S. meliloti* semble avoir un rôle prépondérant dans la protection des bactéries contre l'activité antimicrobienne des NCRs, permettant ainsi le maintien des bactéries après l'infection. Il est probable que la fonction de BacA soit de procéder à l'internalisation des NCRs afin de les enlever de leur site de toxicité, la membrane. En accord avec ce modèle, il a été constaté que le gène *bacA* chez les rhizobia n'est nécessaire pour la symbiose que pour la nodulation des Légumineuses produisant des NCRs (Maruya et Saeki, 2010 ; Haag *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont apportés des résultats similaires chez d'autres espèces, comme *Mycobacterium tuberculosis* (Domenech, *et al.*, 2009), *Salmonella enterica* (Pränting *et al.*, 2008), *Mesorhizobium huakuii* (Tan *et al.*, 2009), *Brucella abortus* (Levier *et al.*, 2000), chez lesquelles des homologues de BacA ont été caractérisés. Ces études mettent en exergue le rôle principal de BacA dans l'internalisation de peptides antimicrobiens, et donc la résistance face à ces derniers.

### **Premier volet de la thèse : L'expression des gènes NCRs chez *Medicago***

C'est dans le contexte décrit ici en haut que j'ai débuté ma thèse. Dans un premier volet de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'étude de la spécificité de l'expression des gènes *NCR* chez la Légumineuse *M. truncatula* en tirant profit de la base de données MtGEA (*Medicago truncatula Gene Expression Atlas*), qui regroupe des profils transcriptomiques obtenus par hybridation de puces à ADN Affymetrix (50 900 sondes). Cette base de données regroupe des expériences réalisées sur différents organes (feuilles, racines, fleurs, fruits, nodosités...) et en réponse à de nombreux stimuli (hormones, stress biotiques et abiotiques, interactions symbiotiques...). Ainsi, nous avons pu analyser l'expression de 334 gènes *NCR* dans 267 différentes conditions expérimentales. Nous avons également généré des plantes transgéniques portant des fusions transcriptionnelles pNCR-*GUS* pour trois NCRs représentant différentes classes temporelles d'expression. Ces lignées transgéniques ont été utilisées pour analyser l'activité des promoteurs (révélant ainsi le patron d'expression génique des *NCR* considérés) au cours d'une cinétique d'infection par *S. meliloti* ou en réponse à l'inoculation par différents agents pathogènes.

Nous avons trouvé que l'ensemble des environ 300 gènes *NCR* testés (sauf cinq) n'est exprimé que dans les nodosités, ils ne sont pas exprimés dans d'autres organes de la plante, ni

lors d'une infection par des agents pathogènes. De plus l'expression des NCR n'est induite en réponse à aucune interaction biotique ou abiotique testée.

Dans les nodosités, les NCR ne sont pas encore exprimés à des stades précoces du développement, avant que les cellules symbiotiques ne soient formées et que les rhizobia ne soient libérés dans les symbiosomes des cellules hôtes. Ils ne sont pas impliqués dans la dégradation des bactéroïdes pendant la sénescence des nodosités et leur expression s'arrête lorsque la sénescence est lancée.

Cependant, le profil d'expression des NCR par des vagues successives au cours de la formation de nodosités suggère que les bactéroïdes sont les seules cibles des peptides et qu'un ensemble de peptides pourrait être impliqué dans la différenciation des bactéroïdes et d'autres dans leur fonctionnement.

Ces analyses expérimentales, ensemble avec des calculs d'entropie de Shannon, montrent que les gènes *NCRs* ont une spécificité d'expression exceptionnelle indiquant qu'ils subissent une régulation extrêmement stricte.

L'ensemble de ces résultats a mené à une publication dans la revue BMC Genomics (voir **chapitre I** des résultats) dont je suis co-premier auteur. Cette étude montre que l'expression des NCR est soumise à une régulation stricte et qu'ils sont activés pendant l'organogenèse et au cours du développement nodulaire dans les cellules symbiotiques polyploïdes.

Ce travail débouche sur de nombreuses pistes de recherche. Ainsi il serait intéressant d'identifier les bases moléculaires de cette régulation génique. Ce contrôle très strict est-il uniquement dû à l'action de répresseurs/activateurs transcriptionnels ? Ou est-ce qu'un contrôle épigénétique est impliqué, possiblement par le biais de la méthylation de l'ADN ou selon les marques d'histones présentes dans les régions génomiques portant des gènes *NCR* ?

L'endoréplication des cellules végétales était une étape majeure dans l'activation des gènes de nodulation. La plupart des gènes nodosité-spécifiques ne sont pas exprimés dans les autres tissus. Ces gènes sont donc maintenus dans un état inactif pendant tout le développement végétal et l'inactivation transcriptionnelle est levée pendant le développement des nodosités. Cette régulation pourrait dépendre des processus épigénétiques résultant des modifications de la structure chromatinienne (modifications post-traductionnelle des histones et méthylation de l'ADN) pendant la formation des nodosités. Au laboratoire, nous avons proposé que l'endoréplication, pendant la différenciation cellulaire dans les nodosités, fasse partie des mécanismes qui lèvent l'inactivation transcriptionnelle des gènes spécifiques des nodosités, ceci résultant de modifications des codes épigénétiques au niveau de la chromatine.

Afin de vérifier le rôle de l'endoréplication dans l'activation du transcriptome, une approche intéressante, actuellement poursuivie au laboratoire, consiste à trier par cytométrie en flux des noyaux, en fonction de leur contenu nucléaire pour ensuite faire chez chacun de ces types nucléaires l'analyse du transcriptome. Cette analyse est couplée avec celle de la structure de la chromatine (méthylation d'ADN et modifications des histones) au niveau des loci génomiques portant les gènes spécifiques des nodosités.

## **Deuxième volet de la thèse : La différenciation des bactéroïdes chez *Aeschynomene***

Les mécanismes de contrôle par la plante sur les rhizobia intracellulaires demeurent à ce jour peu connus et le seul modèle étudié, au début de ce travail de thèse, restait l'interaction entre *M. truncatula* et *S. meliloti*. Les études sur ce modèle ont notamment permis de montrer que la plante exerce un contrôle sur la bactérie via les peptides NCRs (Van de Velde *et al.*, 2010). Cependant, ce mécanisme a été supposé spécifique au clade IRLC, un clade de Légumineuses induisant des morphotypes E et absente chez des Légumineuses induisant des morphotypes U (Alunni *et al.*, 2007) car la présence de NCR n'a pas été à ce jour révélée chez d'autres espèces de Légumineuses.

**On peut donc s'interroger sur l'existence possible d'autres clades de Légumineuses dans lesquels les bactéroïdes se différencient ? Et si oui, est ce que la différenciation repose sur les mêmes mécanismes que ceux observés chez les IRLC auxquels appartient *Medicago*?**

Je me suis donc intéressée à la symbiose de certaines Légumineuses tropicales du genre *Aeschynomene* appartenant au clade des Dalbergioïdes. Les *Aeschynomene* sont étroitement liées à l'arachide, deuxième culture de Légumineuse cultivée dans le monde et donc ce modèle est très pertinent pour l'agronomie. Les *Aeschynomene* se caractérisent par des propriétés symbiotiques très originales. Tout d'abord, la nodulation peut avoir lieu aussi bien sur les racines que sur les tiges conférant à ces plantes un fort potentiel de fixation d'azote (Giraud *et al.*, 2000 et 2004). De façon surprenante, certaines espèces d'*Aeschynomene* ne nécessitent pas la synthèse de facteur Nod par la bactérie pour l'induction de la nodulation (Giraud *et al.*, 2007), alors que ces molécules étaient jusqu'alors considérées comme des signaux ayant un rôle clé et essentiel dans la mise en place de la nodulation chez tous les légumineuses. De plus, les symbiotes, appartenant au genre *Bradyrhizobium*, ont également des caractéristiques inhabituelles pour des rhizobia, comme leur capacité de



photosynthèse et de fixation d'azote en culture.

Le genre d'*Aeschynomene* apparaît également comme un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de différenciation des bactéroïdes. En effet, il peut être observé chez les *Aeschynomene* des différences morphologiques drastiques pour la même bactérie selon l'espèce de la plante hôte. Par exemple, les bactéroïdes de la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS285, microsymbionte d'*Aeschynomene* présentent chez *Aeschynomene afraspera* une morphologie en bâtonnet allongé. Le morphotype allongé (morphotype E) observé chez *A. afraspera* ressemble à celui de *S. meliloti* en symbiose avec *M. truncatula*. (Bonaldi *et al.*, 2011). Récemment, un nouveau morphotype de bactéroïde a été identifié chez *Aeschynomene indica*. Ces bactéroïdes sont sphériques (morphotype S) et peuvent être induits par la souche ORS285.

De plus, la souche *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (une souche non-photosynthétique et non capable de fixer l'azote en état libre mais seulement en condition de symbiose), le microsymbionte de soja, est capable de noduler efficacement *A. afraspera* (Renier *et al.*, 2011).

**Le deuxième objectif** de ma thèse a donc consisté à comprendre **les mécanismes de la différenciation bactérienne au sein des nodosités chez les *Aeschynomene*.**

#### ❖ **Différenciation terminale des bactéroïdes chez *Aeschynomene***

Le processus de différenciation des bactéries lors de la symbiose avec les Légumineuses peut être plus ou moins drastique. Dans le cas de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti*, cette différenciation est dite 'terminale'. Le fait que la même bactérie (la souche ORS285) puisse avoir deux morphotypes différents en fonction de la plante infectée souligne que cette différenciation est sous le contrôle de la plante. C'est sur la validation de cette hypothèse que nous avons collaboré avec l'équipe d'Eric Giraud pour caractériser en premier lieu l'état de différenciation des bactéroïdes dans les nodosités induites par la souche *Bradyrhizobium* sp. ORS285 et de décrypter les facteurs de la plante qui induisent cette différenciation.

Le travail a pu démontrer que les bactéroïdes aussi bien allongés que sphériques présentent un niveau d'endoréplication quatre à huit fois supérieur à celui des bactéries en vie libre (7C chez *A. afraspera* et 16C chez *A. indica*). Une perte d'intégrité de la membrane et un taux de viabilité extrêmement faible ont également été observés. En dehors de leur morphologie, les bactéroïdes présentent donc des propriétés très similaires chez les deux

plantes mais également semblables à celles de *S. meliloti* en symbiose avec *M. truncatula*. Elles sont à différenciation terminale et polyploïdes.

**Ces ressemblances soulèvent une question : Quels sont les effecteurs de la plante forçant les bactéroïdes à se différencier en bloquant les divisions et en favorisant l'endoréplication ?**

#### ❖ Identification de gènes *NCRs* chez *Aeschynomene*

Les mécanismes de différenciation pourraient être conservés chez les trois plantes (*A. indica*, *A. afraspera* et *Medicago*). Le contrôle de cette étape, chez les *Aeschynomene*, pourrait également impliquer des NCR. En accord avec cette hypothèse, une étude a été menée par l'équipe d'Eric Giraud pour identifier des facteurs de la plante qui imposent une différenciation morphologique des bactéroïdes par des analyses transcriptomiques (banque EST) dans les nodosités d'*A. afraspera* et *A. indica*. Cette approche a permis de mettre en évidence l'existence d'une famille de gènes *NCR-like* spécifiquement et fortement exprimés dans les nodosités des deux plantes au moment de la différenciation des bactéroïdes (qui a lieu de façon synchrone entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour après inoculation).

Les NCRs d'*Aeschynomene* sont semblables structuralement aux peptides NCR de *Medicago* avec un peptide signal en N-terminal et une séquence mature en C-terminal comprenant des cystéines en positions conservées. Toutefois les NCRs de *Medicago* et d'*Aeschynomene* présentent des différences quant à la position des cystéines et vis-à-vis du peptide signal, suggérant qu'ils ont une origine évolutive différente.

On peut donc émettre l'hypothèse que ces NCR pourraient agir sur la différenciation des bactéroïdes chez *Aeschynomene*. Afin d'évaluer cette hypothèse, une approche par ARN interférant a été réalisée visant à empêcher l'adressage des NCR au bactéroïdes. En effet, l'interrogation du transcriptome d'*A. evenia* a révélé l'existence d'un orthologue de DNF1 et une construction permettant l'atténuation de ce gène par ARNi a été réalisée et introduite *in planta* via *Agrobacterium rhizogenes* (une bactérie tellurique phytopathogène, induisant l'émergence et la prolifération de chevelu racinaire (*hairy root*) à partir du point d'infection de la bactérie). Les résultats obtenus ont montré un défaut de différenciation des bactéroïdes. Elles présentent soit de différents morphotypes au sein de la même cellule soit des bactéroïdes allongées au lieu des sphériques. Parallèlement, une analyse de la localisation spatiale de leurs expressions chez *A. indica* et *A. afraspera* a été effectuée par une approche d'hybridation *in situ* (HIS). Une technique qui permet la détection et la localisation d'ARN messagers sur

coupes histologiques de tissus grâce à l'utilisation de sondes ARN complémentaires marquées. Les résultats de l'HIS ont permis d'affirmer que les gènes *NCR* d'*Aeschynomene* sont bien exprimés au niveau des cellules symbiotiques contenant les bactéroïdes. Finalement, une approche de protéomique par spectrométrie de masse a montré que les NCRs sont adressés aux bactéroïdes.

L'ensemble des résultats de cette étude confortent l'hypothèse selon laquelle les mécanismes de différenciation des bactéroïdes en morphotypes E et S chez les *Aeschynomene* sont semblables à ceux identifiés chez *M. truncatula*. Il semble donc qu'au cours de l'évolution, deux clades de Légumineuses relativement éloignés (IRLC et Dalbergoïdes) aient convergé vers l'utilisation de peptides de l'immunité innée afin de contrôler leur symbionte bactérien et d'en tirer un bénéfice maximal au cours de l'interaction symbiotique.

Ces données ont été valorisées dans un article dont je suis co-auteure : **Convergent evolution of endosymbiont differentiation in Dalbergoid and IRLC legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides**, soumis à *Plant Physiology* (voir **chapitre II** des résultats).

Dans la mesure où les NCR-like chez *Aeschynomene* ressemblent aux peptides antimicrobiens NCR de *Medicago*, l'étape suivante a consisté en la recherche de facteurs bactériens qui permettraient aux rhizobactéries de survivre dans les symbiosomes en présence des NCR. **Quels sont alors les facteurs bactériens qui déterminent la différenciation bactérienne chez les *Aeschynomene* ?**

#### ❖ Le transporteur *BclA* de *Bradyrhizobium*

Le gène *bacA* de *S. meliloti*, auparavant caractérisé dans le laboratoire, est nécessaire pour la réponse de la bactérie aux peptides NCR de *Medicago*. Un gène ressemblant fortement au gène *bacA* a été identifié par analyse *in silico* chez les bradyrhizobia et il a été nommé *bclA* pour *bacA*-like.

Mon objectif étant d'étudier le rôle de ce gène au cours de l'interaction symbiotique *Aeschynomene-Bradyrhizobium* : En particulier je me suis intéressée à la différenciation et l'endoreplication des bactéroïdes, à la survie *in planta* ainsi qu'à la réponse face aux peptides antimicrobiens. Cette nouvelle étude a constitué le cœur de ma thèse et sera présentée sous forme de deux publications (qui sont prêts à être soumises) dont je suis le premier auteur (**chapitre III** des résultats).

Lors du crible sur plante d'une banque de mutants insertionnels de la bactérie *Bradyrhizobium* sp. ORS278 (insertion aléatoire du transposon mini-Tn5), un mutant dans un gène *bclA* formant des nodosités non-fonctionnelles chez *A. indica* a été identifié (Bonaldi *et al.*, 2010). A cause du spectre d'hôte limité de cette bactérie, le mutant *bclA* dans la souche ORS278 ne permet d'étudier le rôle de ce gène que chez *A. evenia* ou *A. indica* formant ainsi des bactéroïdes du morphotype S. Afin d'étendre cette étude aux morphotypes E et U, la construction par génétique inverse de mutants de délétion du gène *bclA* chez ces deux souches de *Bradyrhizobium* ORS285 et USDA110 a été réalisée. Cela nous a permis d'étudier l'implication du gène *bclA* dans la survie des bactéroïdes au sein des nodosités, et de déterminer son rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens.

Pour répondre à ces questions, la capacité du mutant *bclA*, de chaque *Bradyrhizobium* étudié, à infecter et à se maintenir dans les nodosités de soja et des *Aeschynomene*, a été étudiée. En parallèle, des tests de sensibilité aux peptides antimicrobiens NCR, à la bléomycine et à Bac7, ont été réalisés afin d'évaluer le rôle de BclA dans la réponse de la bactérie aux divers peptides antimicrobiens.

Pour ce faire, les phénotypes symbiotiques du mutant ORS285 $\Delta$ *bclA* (la structure des nodosités, la différenciation des bactéroïdes et la fonctionnalité de nodosités) ont été analysés sur les plantes hôtes *A. indica* et *A. evenia* (bactéroïdes du morphotype S) et *A. afraspera* (bactéroïdes du morphotype E). Dans les différents systèmes symbiotiques testés, des nodosités non-fonctionnelles ont été formées. Cependant, les cellules de ces nodosités sont infectées normalement par les bactéries, mais celles-ci ne se différencient pas en bactéroïdes allongées ou sphériques et restent inchangées et meurent ensuite rapidement. Cet état de non-différenciation a été confirmé par des mesures de la ploïdie des bactéroïdes, elle est de l'ordre de 3C chez *A. indica* et *A. afraspera*. Il semble alors qu'il y a une corrélation entre la présence du gène *bclA* et la formation des bactéroïdes polyploïdes. Par ailleurs, on a pu démontrer que le gène *bclA* de *Bradyrhizobium* peut compléter le phénotype symbiotique du gène *bacA* chez *S. meliloti* avec une restauration de la différenciation des bactéroïdes dans les nodosités de *Medicago*, bien que cette complémentation n'est que partielle et insuffisante pour restaurer la capacité de la souche à fixer l'azote.

Le gène *bacA* chez *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti* ou *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* n'est pas nécessaire pour la formation de bactéroïdes du morphotype U (Karunakaran *et al.*, 2010; Maruya et Saeki; 2010 Ardissonne *et al.*, 2011). Nous avons donc testé la nécessité du gène *bclA* de *Bradyrhizobium* en cas de formation de bactéroïdes du morphotype U. *B. japonicum* USDA110 induit des nodosités fonctionnelle

chez le soja et aussi chez *A. afraspera*. Chez le soja les bactéroïdes sont du morphotype U tandis que chez *A. afraspera* les bactéroïdes sont très légèrement allongées et ne sont quasiment pas polyploïdes (3C). Cette dernière observation était inattendue, vu la production des NCRs par *A. afraspera*. Effectivement, nous avons montré par qPCR qu'aussi dans les nodosités d'*A. afraspera* infectées par USDA110, les gènes *NCRs* sont normalement exprimés. Possiblement des facteurs génétiques de la souche USDA110 rendent la bactérie insensible au peptide NCRs.

L'analyse des phénotypes symbiotiques du mutant *B. japonicum* USDA110 $\Delta$ *bclA* chez *A. afraspera* et le soja a montré que le gène *bclA* de *B. japonicum* n'est pas nécessaire pour la formation de bactéroïdes non différenciées. Le contenu en ADN des bactéroïdes est alors très similaire à celui des bactéries en culture.

### ❖ **BclA est un transporteur de NCRs et autres peptides antimicrobiens**

Bien que BacA et BclA ont un rôle clé au cours du processus symbiotique, ces deux protéines n'ont pas une fonction exclusivement symbiotique, car des gènes homologues sont conservées chez d'autres bactéries, inclus des agents pathogènes de Mammifères comme *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Escherichia coli* (le gène homologue de *bacA* est alors nommé *sbmA*) et s'avèrent cruciaux pour la persistance de la bactérie dans son hôte et donc pour le succès de l'infection (Ferguson *et al.*, 2004). BclA est un transporteur de type ABC qui diffère de ses homologues BacA (*S. meliloti*) et SbmA (*E. coli*) par la présence d'un domaine ATPase, absent chez ces derniers.

Il a été démontré, chez *S. meliloti* et *E. coli* que le gène *bacA/sbmA* affecte leur sensibilité à des peptides antimicrobiens qui agissent sur l'enveloppe bactérienne telles que les défensines, à d'autres peptides antimicrobiens qui agissent à l'intérieur des cellules tels que la bléomycine (un antibiotique qui inhibe la transcription et de la réplication de l'ADN) et Bac7 (peptide riche en proline, se lie aux ribosomes et inhibe la traduction). L'internalisation de la bléomycine est en majorité dépendante du mécanisme lié à BacA (Wehmeier *et al.*, 2010). La résistance à la bléomycine observée chez les mutants *bacA* s'explique alors par l'absence du transporteur BacA, qui ne l'internalise plus, limitant sa toxicité. Les orthologues de *bacA* chez *E. coli* et *S. meliloti* sont requis pour l'internalisation de Bac7 (Mattiuzzo *et al.*, 2007; Marlow *et al.*, 2009), ce qui provoque une sensibilité à ce peptide. C'est pourquoi, lorsque les gènes *bacA* de ces bactéries sont mutés, il y a une diminution de la sensibilité à Bac7.

Donc la question se pose si BclA est capable de transporter la bleomycine, Bac7 comme ses homologues BacA et SbmA. Ainsi, des tests de sensibilité *in vitro* ont été effectués et ont montré que la présence de BclA augmente significativement la sensibilité des bactéries à ces agents antimicrobiens confirmant que BclA peut importer ces peptides. En plus, nous avons montré que BclA augmente la résistance à l'activité antimicrobienne des NCRs comme la protéine BacA. Finalement, nous avons utilisé un peptide NCR modifié avec un groupe fluorescent, combiné avec une analyse par cytométrie en flux pour montrer que BclA ainsi que BacA peut promouvoir l'import de ce NCR démontrant ainsi que BclA et BacA sont des transporteurs de peptides NCRs.

## **Conclusions générales**

Ainsi des résultats originaux ont été obtenus sur le mode de différenciation des bactéroïdes chez les *Aeschynomene*. Leurs bactéroïdes sont allongés ou sphériques selon la plante hôte, ils présentent une différenciation terminale et sont polyploïdes comme les bactéroïdes des Légumineuses appartenant aux IRLC. Les analyses transcriptomiques, hybridation *in situ* et protéomiques (Czernic *et al.*, 2015) ont démontré que les cellules symbiotiques dans les nodosités d'*Aeschynomene* produisent des peptides NCR, qui sont transportés vers les bactéroïdes. Le blocage du transport des NCR dans la voie de sécrétion par ARNi (extinction de l'orthologue de *DNFI*) inhibe la différenciation des bactéroïdes. Ces résultats suggèrent que la différenciation des bactéroïdes dans le clade des Dalbergoïdes, qui a probablement évolué indépendamment de la différenciation des bactéroïdes dans le clade des IRLC, repose sur des mécanismes très similaires (Czernic *et al.*, 2015).

Les connaissances acquises au cours des dernières années sur le rôle des NCR dans la différenciation des bactéroïdes chez *M. truncatula*/*S. meliloti* offre de nombreuses perspectives de travail sur les NCRs identifiés chez les *Aeschynomene*. De plus, la technique de transformation par *hairy root* permet d'envisager une approche par gain de fonction (Bonaldi *et al.*, 2010). Il serait par exemple possible de tester la capacité des NCRs d'induire la différenciation des bactéroïdes chez le soja ou des NCRs d'*A. indica* à induire un morphotype S chez *A. afraspera*.

En outre, nous avons montré que *Bradyrhizobium* ORS278 et ORS285 nécessitent le transporteur de peptides BclA à la fois pour la différenciation des bactéroïdes de morphotypes E et S. BclA possède une fonction similaire à la protéine BacA de *S. meliloti* qui est nécessaire pour la différenciation des bactéroïdes chez *Medicago* et qui joue aussi un rôle

dans le transport des peptides antimicrobiens, les NCR, dans les cellules bactériennes. BclA peut aussi remplacer fonctionnellement BacA dans le transport des peptides. Ces observations confortent fortement la conclusion que chez les *Aeschynomene*, la différenciation des bactéroïdes en morphotype E ou S est sous le contrôle de la famille des peptides NCRs.

Ces mécanismes de différenciation des bactéries symbiotiques ne sont étonnement pas limités aux couples Légumineuses-rhizobia. En effet, certains insectes, comme le puceron *Acyrtosiphon pisum*, effectuent aussi une symbiose avec des bactéries qui se différencient en adoptant un morphotype S. Des peptides antimicrobiens produits par l'insecte, et possédant des motifs conservés en cystéine ainsi qu'un signal peptide ont été identifiés et nommés BCR pour *Bacteriocyte-specific Cysteine Rich peptides* (Shigenobu et Stern, 2012). Par ailleurs, chez un charançon ravageur de céréales (*Sitophilus zeamais*), des peptides antimicrobiens ont été montrés comme induisant la différenciation de bactéries symbiotiques en morphotype E (Login *et al.*, 2011). Ces mécanismes de différenciation, imposés par un hôte eucaryote à un symbionte procaryote par l'intermédiaire de peptides antimicrobiens dérivés de l'immunité innée, sont apparus indépendamment à plusieurs reprises chez les plantes et les animaux, suggérant que ce type de stratégie confère un avantage à l'hôte eucaryote.

Les NCR sont des peptides cationiques qui assurent une activité inhibitrice de la croissance microbienne et plusieurs études montrent que les peptides cationiques sont des effecteurs de réponses immunitaires innées. Ceci suggère que les NCR pourraient être des candidats prometteurs pour la mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes.

L'étude de *Sinorhizobium meliloti* et de ses hôtes végétaux est un sujet de recherche relativement bien développé. En effet, outre le fait que *S. meliloti* est le symbionte de la luzerne, *Medicago sativa*, et de la Légumineuse modèle *Medicago truncatula*, c'est aussi une  $\alpha$ -protéobactérie très proche de bactéries pathogènes comme *Agrobacterium* et autres. L'étude du processus d'infection de *M. truncatula* par *S. meliloti* pourrait fournir des gènes candidats pour l'étude des mécanismes pathogènes de ces dernières et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Outre cette connaissance fondamentale des gènes et acteurs moléculaires impliqués dans le mécanisme de différenciation, il demeure important de comprendre si ce processus confère un véritable avantage fonctionnel à la plante. Une étude récente suggère que ce processus de différenciation morphologique ne serait pas un caractère ancestral mais serait apparu à plusieurs reprises de façon indépendante dans la famille des Légumineuses (Oono *et al.*, 2010). Une autre étude qui compare l'efficacité symbiotique de différents couples rhizobium-Légumineuse dans lesquels la même bactérie subit ou non une différenciation

montre une meilleure performance symbiotique pour les bactéroïdes différenciés morphologiquement (Oono et Denison, 2010). Ces études suggèrent ainsi que ce processus de différenciation morphologique constituerait un avantage évolutif pour le partenaire végétal.

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette amélioration des performances symbiotiques : **i)** l'endoréplication du génome de la bactérie permettrait d'assurer une activité métabolique supérieure comme cela est observé chez les plantes et ainsi une plus forte activité de la nitrogénase (Kondorosi *et al.*, 2000), **ii)** la fragilisation des parois bactériennes permettrait à la plante de récupérer plus efficacement les nutriments investis dans le développement de la biomasse bactérienne lors de la sénescence de la nodosité (Vasse *et al.*, 1990), et **iii)** cette même fragilisation permettrait de favoriser les échanges nutritionnels entre les deux partenaires.

Nos observations, conduites chez deux espèces d'*Aeschynomene* (*A. indica* et *A. afraspera*) en utilisant la même bactérie (ORS285), suggèrent qu'il peut y avoir aussi des différences de performance entre des bactéroïdes différenciés morphologiquement. La comparaison des résultats de fixation de l'azote et de cytométrie en flux indique que le niveau d'endoréplication des bactéroïdes est corrélé à leur efficacité symbiotique. En effet les bactéroïdes de morphotype U (*B. japonicum* USDA110/soja), qui n'ont pas effectué d'endoréplication, fixent moins bien l'azote (fixation normalisée par masse de nodosités) que des bactéroïdes de morphotype E (*B. japonicum* USDA110-*Bradyrhizobium* sp. ORS285/*A. afraspera*). Ces bactéroïdes endorépliqués (7C) fixent eux-mêmes moins bien l'azote que les bactéroïdes de morphotype S (*Bradyrhizobium* sp. ORS285/*A. indica*) qui ont effectués davantage d'endoréplication (16C).

Les raisons de cet avantage ne sont pas connues, mais nous pouvons supposer que la forme sphérique des bactéroïdes pourrait permettre, compte tenu de l'encombrement minimal assuré par cette forme, un meilleur remplissage des cellules végétales et ainsi d'améliorer l'efficacité de la fixation d'azote des nodosités (Wadisirisuk et Weaver, 1985). En accord avec cette hypothèse, des mesures du nombre de bactéroïdes (comptage sur cellule de Malassez) par unité de biomasse nodulaire montre que la densité en bactéroïdes est 25% supérieure dans le cas d'*A. indica*. Il est par ailleurs possible, comme le suggère l'analyse en cytométrie en flux que le niveau d'endoréplication soit plus important sous cette conformation, et que le métabolisme bactérien soit plus actif dans cet état. Il est donc tentant de suggérer que plus l'endoréplication subie par les bactéroïdes est importante, plus ils sont efficaces pour la fixation de l'azote.



Ces résultats préliminaires sont très intéressants et méritent d'être approfondis en plus grand détail. En outre, il sera très intéressant de faire des analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques sur les trois morphotypes (U, E et S) afin de comprendre les bases moléculaires et métaboliques de cette différence d'efficacité entre les différentes formes de bactéroïdes. L'intégration des analyses transcriptomiques, protéomiques et métaboliques permettra d'identifier des gènes et des voies métaboliques qui sont spécifiques à un ou plusieurs morphotypes de bactéroïdes. Les résultats qui découleraient d'une telle étude devraient permettre d'améliorer plus largement la compréhension des mécanismes contrôlant et régulant la différenciation des bactéroïdes lors de la mise en place de la nodosité ainsi que l'impact sur la fixation symbiotique d'azote.

Enfin, dans le cas où des déterminants majeurs de la différenciation des bactéroïdes seraient identifiés, l'obtention de souches bactériennes, dans lesquelles ces déterminants moléculaires sont modifiés, pourrait permettre, à plus long terme, de créer des systèmes symbiotiques plus efficaces chez des espèces d'intérêt agronomique majeur, tel que le soja. De la même manière, on pourrait introduire des gènes NCRs chez des plantes qui n'en possèdent pas afin d'induire la différenciation des bactéroïdes et ainsi d'améliorer l'efficacité de la fixation d'azote.